

学校编码:

密级_____

学号: 24520091153063

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

Twist2 在乳腺癌中的异质性表达及意义

Significance of Heterogeneous Twist2 Expression in Human
Breast Cancers

张妮妮

指导教师姓名: 毛宇彬 副教授

专 业 名 称: 肿瘤学

论文提交日期: 2012 年 4 月

论文答辩日期: 2012 年 4 月

2012 年 4 月

Twist2 在乳腺癌中的异质性表达及意义

张妮妮

指导教师

毛宇彬

副教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

目的: 观察 Twist2 在乳腺癌组织中的表达及其与乳腺癌各临床病理因素的相关性, 并分析 Twist2 和 E-cadherin 表达的关系, 以此探讨 Twist2 在乳腺癌侵袭转移中的作用。

方法: 采用免疫组织化学方法(二步法)检测乳腺癌组织芯片(6 例纤维腺瘤、13 例乳腺腺病、16 例乳腺炎和 141 乳腺癌)和常规石蜡切片中 Twist2 的表达情况, 分析 Twist2 在乳腺癌中的表达与患者年龄、临床分期、肿瘤分型和远处淋巴结转移的关系。进而检测了 Twist2 表达与 ER、PR、ErbB2 的关系, 并且分析 Twist2 与 E-cadherin 的表达情况, 分别依次分析肿瘤原位癌巢、侵袭部位和转移至淋巴组织的癌巢中两者的表达关系。为明确 Twist2 在 EMT 中的作用, 选取了高度表达 E-cadherin 的人乳腺癌细胞株 MCF7, 利用基因转染技术, 构建 Twist2 高表达的人乳腺癌细胞株 Twist2/MCF7, 采用免疫荧光技术检测 MCF7、Vector/MCF7 和 Twist2/MCF7 中 Twist2 和 E-cadherin 的表达情况。

结果: Twist2 在正常乳腺组织、纤维腺瘤、乳腺腺病、乳腺炎和乳腺癌的表达有显著性差异, 在正常乳腺组织中无表达, 在乳腺癌中显著高表达, 且主要表达在细胞质, Twist2 表达与乳腺癌的 TNM 临床分期和远处淋巴结转移有明显相关性, 其高表达伴随着 TNM 临床分期级别的增高及远处淋巴结转移的增加。在乳腺导管癌中, 在原位癌巢和转移至淋巴中的癌组织中, Twist2 在细胞质中表达, 伴随 E-cadherin 的膜表达; 而在癌侵袭部位, Twist2 在细胞核表达, 同时伴随 E-cadherin 表达缺失。当 Twist2 稳定转染至乳腺癌细胞 MCF7 时, 主要在细胞浆表达, 而当 Twist2 一过性地表达在细胞株 Twist2/MCF7 的细胞核中, 同时 E-cadherin 的表达缺失, 提示 Twist2 的细胞质表达与 E-cadherin 无关, Twist2 核表达与 E-cadherin 表达缺失相关。

结论: 乳腺癌中 Twist2 高表达与乳腺癌临床分期和远处淋巴结转移有关, 提示 Twist2 参与了乳腺癌的发展和转移。Twist2 在细胞中不同的定位表达可能与肿瘤的分期有关。在原位癌巢和转移至淋巴的乳腺癌组织中, Twist2 在细胞质表达, 使得乳腺癌上皮特征仍保持, E-cadherin 表达在细胞膜上。然而当癌细胞侵袭时, Twist2 表达于细胞核中, 促使 EMT 发生, 癌细胞上皮性质被剥夺, 向间质细胞

转化，E-cadherin 的表达也缺失，如此有助于细胞的浸润和转移。本研究结果表明 Twist2 的异质性表达对乳腺癌的分期和预后具有指导意义，证实了 Twist2 核表达促进 EMT 的发生，首次为揭示 EMT 相关基因促进一过性 EMT 提供了体内证据。

关键字：乳腺癌；Twist2 ； E-cadherin； EMT； 侵袭转移

Abstract

Objective: To investigate the expression and clinical significance of transcription factor Twist2 in human breast carcinoma with clinicopathological factors. And detecting the expression of Twist and E-cadherin in breast cancer to explore their relationship and the role of Twist2 in invasion and metastasis of breast cancer.

Method: Immunohistochemistry was used to detect the expression of the Twist2 protein in histologic sections of human normal breast tissue, breast carcinoma and 1 cases of microarray tissue (including 6 cases of fibroadenoma, 13 cases of mammaryadenosis, 16 cases of mastitis and 141 cases of malignant tumor). Twist2 expressions were analyzed together with its relation to ages, histologic type, TNM clinical stage, distant lymph node metastasis. Furthermore, the relationship between Twist2, ER, PR and ErbB2 was detected. And then study the correlation of Twist2 and E-cadherin in tumor center, lymph metastases and the the invasive front in 20 cases of ductal breast carcinomas with positive expression of Twist. In order to define the role of Twist2 in EMT, the Twist2 gene was stably transfected into MCF7, an E-cadherin-high-expression breast cancer cell line, to establish Twist2-expression cell strain Twist2/MCF7. Immunofluorescence assay were used to detect Twist2 and E-cadherin expression in MCF7, Vector/MCF7 and Twist2/MCF7.

Results: A statistically significant difference of Twist2 expression was observed among normal breast tissues, fibroadenoma, mammaryadenosis, mastitis and malignant tumor. And the Twist2 protein could be seen predominantly in cytoplasm of cancer cells. In addition, the high levels of Twist2 were correlated with TNM clinical stage and distant lymph node metastasis. Cytoplasmic Twist2 positive cancer cells expressing E-cadherin on the cellular membrane were mainly located at tumor center of primary carcinomas and lymph metastases, while cancer cells with nuclear Twist2 clearly showed loss of E-cadherin and were detected at the invasive front in ductal breast carcinomas. When Twist2 was stably transfected into MCF7, the expression of

E-cadherin in Twist2/MCF7 was normal with Twist2 located in cytoplasm. However, E-cadherin was abrogated or markedly reduced in Twist2/MCF7 with Twist2 localized into the nucleus transiently. This study suggested that the nuclear expression of Twist2 was negative related with the expression of E-cadherin.

Conclusion: The expression level of Twist2 protein in breast cancer tissue were significantly raised and the high levels of Twist2 were correlated with clinical stage and distant lymph node metastasis, suggested Twist2 gene might be involved in the initiation and progression of breast carcinoma. The differential cellular distribution of Twist2 may be associated with tumor progression. The cytoplasmic Twist2 in cancer cells at tumor center of primary carcinomas and lymph metastases contributes to the maintenance of epithelial cancer characteristics expressing E-cadherin in a noninvasive state, while the nuclear Twist2 in the cancer invasion front activates EMT to deprive epithelial property of neoplastic cells, thus facilitates invasion and metastasis. These findings suggest that heterogeneous expression of Twist2 has important meaning for the breast carcinoma clinical stage and prognosis, prove that the nuclear Twist2 promote EMT and offer the evidence for EMT related gene transiently activate EMT in vivo.

Keywords: breast cancer; Twist2; E-cadherin; EMT; metastasis

目 录

摘 要	I
Abstract	III
第一章 前 言	VII
1.1 Twist1 和 Twist2 的结构和功能	1
1.1.1 Twist1 和 Twist2 的基本结构	1
1.1.2 Twist1 的生物学功能	4
1.2 EMT 与乳腺癌	8
1.2.1 乳腺癌的常用指标及乳腺癌的异质性特点	9
1.2.2 EMT 在肿瘤发生发展中的机制研究	10
1.2.3 乳腺癌中 EMT 的证据	12
第二章 材料和方法	17
2.1 实验材料	17
2.1.1 质粒、细胞株、肿瘤及正常组织标本	17
2.1.2 主要试剂	17
2.1.3 主要仪器	18
2.1.4 试剂的配置	19
2.2 实验方法	22
2.2.1 石蜡切片与免疫组织化学染色	22
2.2.2 细胞培养	24
2.2.3 细胞转染和免疫细胞化学染色	26
2.2.4 蛋白印迹	27
2.2.5 RT-PCR	31
2.2.6 核浆分离	34
第三章 结果与分析	35

3.1 Twist1 和 Twist2 在人乳腺癌中差异性表达分析	35
3.2 Twist2 蛋白在乳腺癌中的表达特点	37
3.2.1 Twist2 蛋白表达与乳腺癌临床病理参数之间的关系	37
3.2.2 Twist2 蛋白的核浆表达与临床病理参数之间的关系	39
3.2.3 Twist2 蛋白的表达与乳腺癌常规指标 ER,PR,ErbB2 之间的关系 ..	41
3.3 Twist2 在乳腺癌原位癌巢 (TC)、侵袭处(LM)和转移至淋巴组织的新的癌巢中(LM)表达不同	43
3.4 在乳腺癌细胞 MCF7 中, 当 Twist2 在细胞核表达时, 伴随 E-cadherin 的表达降低	46
第四章 讨论	48
第五章 结 论	51
致 谢	52
参 考 文 献	54

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	VII
1.1 The structure and function of Twist1 and Twist2	1
1.1.1 The basic structure of Twist1 and Twist2	1
1.1.2 The function of Twist1	4
1.2 EMT and breast cancer	8
1.2.1 The conventional index and histopathological characterization of breast cancer	9
1.2.2 The mechanism of EMT in tumor	10
1.2.3 Evidence of EMT in breast cancer	12
Chapter 2 Materials and Methods	17
2.1 Materials	17
2.1.1 Plasmids, Cells, Tumors and Normal breast tissues	17
2.1.2 Reagents	17
2.1.3 Instruments	18
2.1.4 Reagents in detail	19
2.2 Methods	22
2.2.1 Paraffin section and Immunohistochemical staining	22
2.2.2 Cell culture	24
2.2.3 Transfection and Immunofluorescence	26
2.2.4 Western blotting	27
2.2.5 RT-PCR	31
2.2.6 Separation of nucleus and cytoplasm	34
Chapter 3 Results	35
3.1 Twist1 and Twist2 are differentially increased in breast cancer	35

3.2 The expression of Twist2 in breast cancer	37
3.2.1 Pathological characteristics of Twist2-expressing breast carcinomas ·	37
3.2.2 The expression of Twist2 in cytoplasm and nucleus of breast carcinoma	39
3.2.3 The relationship between Twist2,ER,PR and ErbB2 in breast cancer ·	41
3.3 Differential levels of Twist2 in tumor center and invasion front within a primary breast carcinoma and the adjacent lymph metastases	43
3.4 Ectopic expression of nuclear Twist2 in MCF7 cells with down-regulates E-cadherin	46
Chapter 4 Discussion	48
Chapter 5 Conclusions	51
Acknowledgements	52
References	54

第一章 前言

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,从 20 世纪 70 年代起,原为乳腺癌低发区的亚洲国家发病率逐年升高,在我国特别是北京、上海等发达城区已成为危害妇女健康的主要恶性肿瘤。上海市乳腺癌发病率 1972 年为 20/10 万,1997 年达 46/10 万,位居女性恶性肿瘤发病率第 1 位。乳腺癌患者死亡的最根本原因不是原位瘤的生长而是由于肿瘤的转移,因此,乳腺癌转移机制的研究具有重要意义。

1.1 Twist1 和 Twist2 的结构和功能

1.1.1 Twist1 和 Twist2 的基本结构

基本的螺旋环螺旋(bHLH)家族包含一系列的转录因子,它们在不同的组织中发挥不同的作用。这些转录因子复杂的调节作用使其在胚胎发育的早期阶段可以微调细胞的命运。DNA 结合 bHLH 转录因子的最主要特征是双重 DNA 结合区域的形成,两个转录因子通过 HLH 基序形成同源或异质二聚体,使得氨基酸的基本延伸能接触到 DNA。这个 DNA 结合区域能够识别富含保守序列 5'-NCANNTGN-3'(称为 E-box)的调控元件。E-boxes 在很多家族的特定基因的调节区域被发现,而这些调节区域参与了转录因子家族调控的大量信号通路^[1, 2]。bHLH 转录家族被划分为三个等级:最普遍的等级 A bHLH 转录因子,含有转录因子 E2-2, HEB 和 E2A 的两个亚型(也称为 E 蛋白);受组织限制的等级 B bHLH 转录因子;抑制 HLH 的蛋白,由 Id 蛋白组成,Id 蛋白缺失与 DNA 接触的基本区域。Twist 家族蛋白属于等级 B bHLH 转录因子的亚族。Twist 家族蛋白包括 Paraxis^[1], Scleraxis^[1], Hand1^[2], Hand2^[3], Twist1 and Twist2。在这个转录因子家族中, Twist1 和 Twist2 表现出高度的序列相似性,这提示他们的作用可能是冗余的。而这两种蛋白在激活和抑制基因的转录方面却呈现了各不相同的作用,这使得它们各自的特征描述变得很复杂^[4, 5]。因此,阐述 Twist1 和 Twist2 的相似点并它们各自不同的基因转录调节作用具有重要的探讨意义。

1.1.1.1 Twist1 的基本结构

第一个被阐述的 Twist 蛋白是 *Drosophila* Twist (DTwist)，它是胚胎发育过程中舌腹发育所必需的合子基因^[6]。同样的，它也是原肠胚和中胚层发育的关键调节子，只是在两个发展阶段中 Dtwist 的表达模式有差异。Dtwist 与果蝇 NF- κ B 同系物 Dorsal 一起界定腹背轴，协同 Snail 促进原肠胚的形成，因此 Dtwist 最初被认为是一个启动子。目前已知，Dtwist 与果蝇的 E-protein Daughterless 可形成同源和异源二聚体，使得它既可以是转录的激活子也可以是抑制子^[7, 8]。虽然在果蝇中，Dtwist 有促进细胞分化的作用，但 Twist1 和 Twist2 在哺乳类动物的经典作用是抑制间质细胞系的分化，尤其是在肌肉和骨骼中。哺乳类的 Twist1 首先在小鼠中被识别出来，是由于它与 Dtwist 有高度的相似性，包括 48% 的氨基酸序列的一致。由于 Twist1 抑制肌细胞和骨骼的形成，因此它被认为是基因转录受体的抑制剂^[9-11]。Twist1 的突变导致了 SaethreChotzen 综合征的发生 (SCS; OMIM 101400)，这是一种颅缝提早闭合的病症^[12, 13]。SCS 病人中所出现的各种突变是由于 Twist1 丧失功能，蛋白质结构的不稳定，以及定位的不准确^[14]。Twist1 敲除小鼠表现出胚胎期死亡，在神经管闭合中出现异常^[15]。Twist1 敲除小鼠的研究发展，带来了中枢-调节条件性敲出的小鼠的出现，可用于研究 Twist1 对后神经嵴细胞迁移的作用^[16]。Twist1-null 的杂合小鼠，同样有类似 SaethreChotzen 综合征的表现^[17]，由此提供了一个研究 SCS 的动物模型。

1.1.1.2 Twist2 的基本结构

Twist2 是第一个从双杂交酵母中用 E12 作为诱饵来扫描而被识别出来的，因为它的表达在小鼠的真皮层 (dermis) 中而被命名为 Dermol^[18]。后来 Dermol 被重新更名为 Twist2，这是基于它与 Twist1 高度同源，并交叉的表达模式。当 Twist2 与 Twist1 一起观察时，发现 Twist2 也抑制肌肉和骨骼的成熟^[18-20]。在哺乳动物的胚胎形成期，Twist2 表达在中胚层，虽然它的表达是短暂的并在 Twist1 之后。Twist2 敲除的小鼠表现了相对正常的胚胎的发展，也没有明显的骨骼畸形，但是却在出生后 2-3 天死于恶病质，发育不良和高水平的炎症因子^[19]。很重要的是 Twist2 敲除小鼠在同系交配 129/Sv 的情形下能够存活，同样的 Twist2 敲除小鼠在 129/C57 杂交的情形下，小鼠只有轻微的恶病质表现并存活下来，这提示修

饰基因存在于不同的遗传背景里^[19]。最新研究显示无意义的(c.324C> T and c.486C>T)在 Twist2 的突变纯合子(c.324C> T and c.486C>T)导致了 Setleis Syndrome (MIM 227260)的发生^[21]。Setleis Syndrome 是一种遗传性的发展性失常, 属为真皮发育不良, Focal Facial Dermal Dysplasia type III (FFDD III), 以两侧颞额的一些病理表现为特征, 包括眼睑睫毛缺失或上眼睑出现多排睫毛, 睑板腺缺乏, 八字眉和下巴分裂^[21]。这些基因突变是在 Twist2 蛋白的谷氨酸 65 和 119 处截断, 导致了 C-端区域的突变(图 1.1)。Twist2 敲出小鼠在 129/C57 杂交的情形下得以存活, 研究显示此种小鼠的面部表现与 Setleis syndrome 患者的表现很相似, 如此为 FFDD III 的研究建立了小鼠模型^[21]。虽然人的 Twist1 和 Twist2 以高度一致的基因序列编码 bHLH 转录因子, 但对 Twist2 隐性突变导致 FFDD 和显性 Twist1 突变导致 Saethre–Chotzen 颅缝早闭的研究提示, 这两个基因在皮肤和骨骼发育中呈现不冗余的作用, 并且也强调了分别研究 Twist1 和 Twist2 的重要性^[21]。Twist2 与 Twist1 存在 66%的一致性, 尤其在基本的 HLH 蛋白区域一致性高达 98%(图 1.1)。两个蛋白的主要区别在 N 端, 此段 Twist1 有两个甘氨酸丰富的区域, 而 Twist2 没有, 这使得含有 202 个氨基酸的 Twist1 比含有 160 个氨基酸的 Twist2 更为庞大。Twist1 中的甘氨酸基序主要用于和 Twist2 接触范围外的蛋白相互作用, 从而使在两个蛋白的功能有所不同(图 1.1)。C 端末尾的 20 个氨基酸包含了一个抑制区域, 被命名为‘Twist box’,它在 Twist1 和 Twist2 中是一致的, 但在其他的 Twist 家族亚型中未被发现^[22]。Twist box 以超激活区域为特征, 包含 Twist1 的氨基酸残基 Leu-187, Phe-191 and Arg-195 (L X3 FX3R), 这些氨基酸在动物中是完全保守的^[5]。在基因水平, Twist1 包含了共同的内含子/外显子区域, 反映了基因的重复性^[11, 21]。

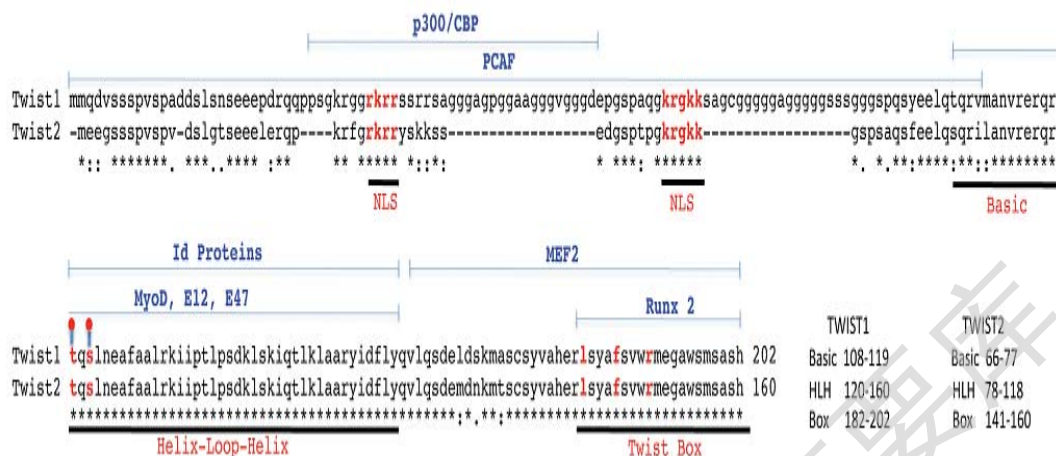


图 1.1 Twist1 和 Twist2 之间的氨基酸序列对比

1.1.2 Twist1 的生物学功能

Twist 是一个进化中保守的转录因子，同其它转录因子一样能在转录水平上调控许多基因的表达^[23, 24]。Twist 有许多生物学功能，在胚胎的发生发展中发挥重要作用，它可以调节胚胎发育过程中的组织重建，并赋予细胞迁移的能力。并且 Twist 蛋白被认为是一种癌蛋白，能影响许多肿瘤细胞的凋亡、侵袭和转移。目前的研究发现，Twist 在多种肿瘤中表达上调，Twist 通过影响肿瘤细胞的凋亡，抑制分化，诱导 EMT，参与肿瘤的耐药，肿瘤的血管生成，从而在肿瘤的发生和发展中起重要作用。

1.1.2.1 Twist 在胚胎发育中的作用

Twist 的生物学功能最初是被发现在果蝇的胚胎发育过程中通过促进表皮-间叶细胞转换 (Epithelial-mesenchymal transitions, EMT) 来调节胚胎的发育，在诱导细胞迁移过程中起关键的调控作用。Twist 广泛表达于中胚层起源的组织细胞，在原肠胚阶段起始中胚层的分化中发挥调控作用，在出生后降至极底水平。

EMT 是胚胎发育阶段一项重要的形态学特征，具体表现为上皮细胞的极性丧失，细胞之间粘连减弱，细胞骨架蛋白重组，细胞迁移和运动能力增强，同时上皮表型丢失而逐渐获得间质表型^[25, 26]。Twist 调控胚胎发育的机制是在转录水平上通过影响 E-boxes 启动子，来抑制 E-上皮钙黏素 (E-cadherin) 的表达，从而诱导 EMT 的形成，其具体机制尚不很清楚^[27, 28]。目前研究表明，在动物胚胎发

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库